



IT 04/381

BEST AVAILABLE COPY

Ministero delle Attività Produttive

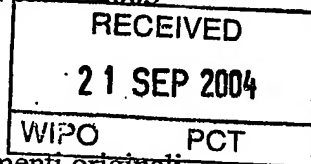
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
Invenzione Industriale N. RM2003A000335 del 09/07/2003



Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

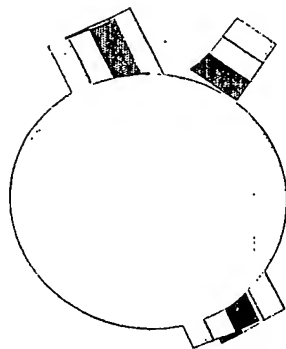
25 AGO. 2004

Roma, li.....

IL FUNZIONARIO

Giampietro Carlotta

Giampietro Carlotta



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"
Residenza I-00185 ROMA / IT

2) Denominazione
Residenza

codice

codice

I. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome CAPASSO Olga, DE SIMONE Domenico, FIORUZZI Maria Augusta cod. fiscale
denominazione studio di appartenenza DE SIMONE & PARTNERS S.P.A.
via Vincenzo Bellini n. 20 città ROMA cap 00198 (prov) RM

DOMICILIO ELETTIVO destinatario Vedi sopra via n. città cap (prov)

TITOLO classe proposta (sez/cl/sci) gruppo/sottogruppo
Sistema di espressione di sirna.

ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA / / N. PROTOCOLLO

INVENTORI DESIGNATI

1) BOZZONI, Irene cognome nome
2) DENTI, Michela Alessandra

3) ROSA, Alessandro cognome nome
4)

PRIORITA' Nazione o organizzazione Tipo di priorità

1) Nessuna

2)

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

ANNOTAZIONI SPECIALI

CUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

- 1) ☒ PROV ☐ n. pag 20 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
2) ☒ PROV ☐ n. tav 6 disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
3) ☒ RIS ☐ Dichiarazione sostitutiva lettera d'incarico,
4) ☐ RIS ☐ designazione inventore
5) ☐ RIS ☐ documenti di priorità con traduzione in italiano
6) ☐ RIS ☐ autorizzazione o atto di cessione
7) ☐ nominativo completo del richiedente

attestati di versamento, totale € 291,80=

PILATO IL 08 / 07 / 03 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Olga Capasso
De Simone & Partners S.p.A.

TINUA (SI/NO) NO

PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) SI

ERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA DI ROMA

CALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

RM 2003 A 000335

codice 58

Reg. A

DUEMILATRE

chiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto

NOVE

del mese di

LUGLIO

TAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

Ufficiale Rogante

NUMERO DOMANDA
NUMERO BREVETTO

RM 2003 A 000335

REG. A

DATA DI DEPOSITO
DATA DI RILASCIO/ /
/ /1. RICHIEDENTE (I)
Denominazione
ResidenzaUNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"
ROMA (IT)

2. TITOLO

Sistema di espressione di siRNA

Classe proposta (sez./cl./scl/)

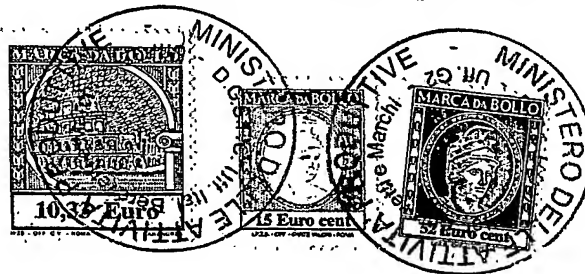
☐

(gruppo sottogruppo)

☐ / ☐

3. RIASSUNTO

E' descritto un sistema di espressione per la corretta, stabile ed efficace espressione in cellule di mammifero di un siRNA comprendente: a) una sequenza promotore dipendente dalla RNA polimerasi II derivata dal gene per lo snRNA U1; a valle di essa b) opportuni siti di restrizione per la clonazione della sequenza trascrivente il pre-siRNA; a valle di essi c) sequenze derivanti da sequenze al 3' del gene per lo snRNA U1 necessarie e sufficienti per una corretta formazione del 3' del pre-siRNA.



DISEGNO

DESCRIZIONE **RM 2003 A 000335**

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione dal titolo:

"Sistema di espressione di siRNA"

a nome: UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"

inventore: Bozzoni Irene, Denti Michela Alessandra, Rosa Alessandro

La presente invenzione concerne vettori ricombinanti per siRNA basati su regioni regolative del gene per lo snRNA U1.

L'interferenza mediata da RNA è un processo di silenziamento genico post-trascrizionale sequenza-specifico, molto conservato dal punto di vista evolutivo. I mediatori della degradazione dell'mRNA sono piccoli RNA di 21-23 nucleotidi (siRNA), generati da taglio con ribonucleasi III da dsRNA più lunghi. Tale processo, inizialmente descritto in *C.elegans* (Fire *et al.*, 1998), e poi in insetti, piante e funghi, è stato recentemente riprodotto in cellule di mammifero con l'uso di piccoli RNA sintetici a doppia elica (21-23 bp, Elbashir *et al.*, 2001). Poiché l'efficacia di tali molecole è molto alta, i duplex di siRNA possono essere di grande utilità per ottenere un'inattivazione genica specifica, in cellule umane e non, e portare allo sviluppo di agenti terapeutici per patologie virali o genetiche.

Recentemente sono stati descritti diversi sistemi per introdurre siRNA in cellule di mammifero a mezzo di trasfezione di oligonucleotidi (Elbashir *et al.*, 2001; McManus and Sharp, 2002). Poiché l'uso di siRNA artificiali ha come svantaggio principale quello di richiedere somministrazioni periodiche, risulta chiara l'esigenza di sviluppare

sistemi plasmidici codificanti siRNAs, per ottenere un effetto a lungo termine.

Al momento tutti i vettori per siRNA dipendono da promotori polIII, come quelli che utilizzano i geni per snRNA U6 (Lee *et al.* 2002; Paul *et al.*, 2002) o RNA H1 (Brummelkamp *et al.*, 2002), o più recentemente una cassetta di espressione per tRNA (Kawasaki and Taira, 2003), si veda anche WO03/006477.

Gli autori della presente invenzione hanno messo a punto un vettore plasmidico alternativo a quelli noti, basato su regioni regolative, dipendenti dalla trascrizione della RNA polimerasi II, del gene per lo snRNA U1. Il promotore di U1 è attivo in tutti i tipi cellulari e determina l'accumulo di elevati livelli di trascritti. Inoltre, la presenza di un elemento al 3' responsabile per la corretta formazione del terminale 3' dello snRNA U1 permette un'efficiente e precisa formazione del 3'.

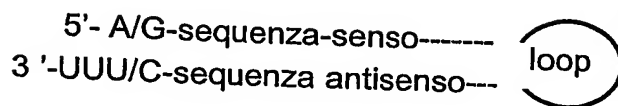
I costrutti della presente invenzione hanno i seguenti vantaggi: i) non richiedono sequenze specifiche per la formazione dei terminali 5' e 3'; ii) il pre-siRNA è esportato rapidamente nel citoplasma dove è convertito efficacemente nella forma matura siRNA; iii) l'inserimento di sequenze è facilmente effettuata con oligonucleotidi a doppio filamento, rendendo inutile il passaggio di amplificazione per PCR con la produzione frequente di prodotti aberranti; iv) il gene per il snRNA U1 è dotato di un promotore pol II forte che non viene silenziato in cloni cellulari stabili. Inoltre, gli autori hanno identificato elementi specifici che permettono di selezionare solo un'elica del siRNA come effettore per la risposta all'interferenza.

Sequenze "hairpin" dirette contro il mRNA per la lamina A/C sono state inserite tra queste regioni regolative e producono un accumulo efficace di siRNAs a doppia elica delle dimensioni attese in vivo. Un'analisi Western delle proteine estratte da cellule HeLa trasfettate con i plasmidi che esprimono siRNA ha dimostrato che i vettori oggetto dell'invenzione sono molto efficaci nel sopprimere l'espressione della proteina lamina A/C. Sono anche state identificate le sequenze che conferiscono un rilascio asimmetrico di una delle due eliche del siRNA.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un vettore ricombinante per la corretta, stabile ed efficace espressione in cellule di mammifero di un siRNA da utilizzare per il silenziamento di un gene, comprendente dal 5' al 3':

- a) una sequenza promotore dipendente dalla RNA polimerasi II derivata dal gene per lo snRNA U1;
- b) opportuni siti di restrizione per la clonazione della sequenza trascrivente un pre-siRNA;
- c) una sequenza trascrivente il pre-siRNA comprendente in posizione +1 un residuo A o G; una sequenza da 21 a 23 nucleotidi corrispondente a una regione senso del mRNA trascritto dal gene da silenziare che costituisce il primo segmento dello "stem" del pre-siRNA; una sequenza selezionata dal gruppo di sequenze dei pre-miRNA che costituisce la regione "loop" del pre-siRNA; una sequenza da 21 a 23 nucleotidi corrispondente alla regione antisense del mRNA trascritto dal gene da silenziare che costituisce il secondo segmento dello "stem" del

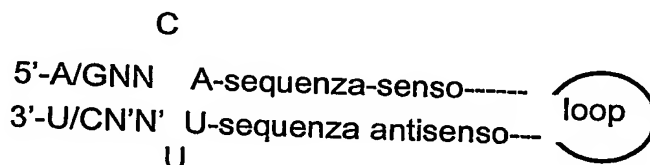
pre-siRNA; due residui finali UU protrudenti in maniera da ottenere la seguente struttura:



d) sequenze terminatrici derivanti da sequenze al 3' del gene per lo snRNA U1 necessarie e sufficienti per una corretta formazione del 3' del pre-siRNA.

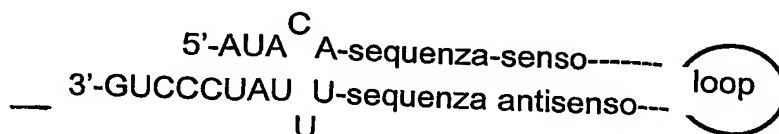
Preferibilmente il sito di clonaggio per il 5' della sequenza trascrivente il pre-siRNA è Bgl II.

Preferibilmente la sequenza trascrivente il pre-siRNA comprende ulteriormente ai terminali 5' e 3' sequenze tali che il pre-siRNA trascritto abbia la seguente struttura:



in cui N è A, U, G o C e N' è il suo complementare.

Più preferibilmente la sequenza trascrivente il pre-siRNA comprende ulteriormente ai terminali 5' e 3' sequenze tali che il pre-siRNA trascritto abbia la seguente struttura:



L'invenzione verrà descritta in esempi esplicativi con riferimento alle seguenti figure:

Figura 1. Rappresentazione schematica del vettore psiUX con l'indicazione dei siti presenti nel polilinker a valle del promotore dello snRNA U1. In basso è mostrata la sequenza della regione del promotore di U1 dalla posizione -393 a -6 rispetto al sito di inizio.

Figura 2. Pannello A): sequenza dei diversi derivati di psiUx con i relativi oligo utilizzati. I terminali 5' e 3' dei trascritti sono indicati. Le sequenze senso e antisense sono dedotte dal mRNA per la lamina A/C e sono rappresentate da frecce convergenti. Le mutazioni introdotte nel costrutto psiUc_{mut}-lam sono indicate al di sopra della sequenza. La sequenza del terminatore al 3' del gene U1 è indicata come "3' box". I "loop" interni e le sequenze varianti presenti nei costrutti psiUb-lam e psiUd-lam sono rappresentate in rosso. Pannello B): Struttura prevista dei quattro trascritti primari anti-lamina che sono stati saggiati. Le frecce indicano i siti presunti di maturazione da parte dell'enzima Dicer. Le sequenze dello siRNA sono mostrate in grassetto e in italico. I nt sottolineati identificano le sequenze derivate dalle regioni al 5' e al 3' dello snRNA U1. L'asterisco rappresenta il cap monometilato.

Figura 3. Analisi dell'espressione e attività degli siRNA trascritti dai costrutti psiUx-lam. Cellule HeLa sono state trasfettate con 6 µg dei diversi costrutti psiU-lam (corsie psiU) o con 6 µg di U6-lam (corsie U6). 2 µg di un costrutto U7 di controllo è stato co-trasfettato in tutti i casi. Dopo 48 ore, l'RNA totale è stato estratto e 15 µg analizzati per

Northern blot su un gel 10% poliacrilammide-urea. Pannelli A) e A'): Ibridazione con i *probes a* e *a_{mut}* che riconoscono l'elica antisenso (indicata da una freccia verso sinistra). Pannello A'') Ibridazione con una sonda specifica per lo snRNA U7. Le parentesi indicano la posizione delle specie precursori. La migrazione di marcatori di peso molecolare pBR322/MspI è mostrata a sinistra. La corsia NT contiene RNA estratto da cellule non trasfettate. Pannello B): ibridazione con il *probe α* che riconosce l'elica senso (indicata da una freccia verso destra). Pannello C) 20 µg di proteine cellulari totali estratte 70 ore dopo trasfezione dalle stesse cellule come nell'esperimento precedente sono stati analizzati per Western con anticorpi monoclonali anti-lamina. Le frecce indicano le due isoforme della lamina (A e C). Al di sotto del pannello è mostrata una colorazione Ponceau del filtro.

Figura 4. Analisi dei trascritti psiUa-lam, psiUb-lam e U6-lam in oociti di *Xenopus laevis*. 2.76 ng di DNA plasmidico sono stati microiniettati nel nucleo di oociti di *Xenopus laevis*. Dopo 12 ore di incubazione l'RNA è stato estratto dai nuclei (N) e dal citoplasma (C) e analizzato per Northern blot su un gel 10% poliacrilammide-urea. Le frecce indicano i trascritti primari. Le parentesi indicano i prodotti di taglio interni all'ansa (si veda la rappresentazione schematica a lato).

Materiali e metodi

Costruzione del vettore psiUx. Il vettore basato sul gene del snRNA U1 è stato derivato dal plasmide pHU1-ID, contenente il gene umano intero (De Angelis *et al.*, 2002); questo plasmide contiene il frammento di 600 bp *Bam*HI contenente l'unità trascrizionale del gene per il snRNA

U1 umano inserito nel sito *Bam*HI del vettore pSP65 (Promega) in direzione opposta a quella del promotore SP6. Il plasmide psiUx è stato derivato da quest'ultimo per doppia digestione con *Bgl*II e *Nhe*I e riligazione in presenza di un polilinker contenente i siti 5'-*Bgl*II, *Kpn*I, *Xho*I, *Nhe*I, *Bam*HI e *Nhe*I-3'. Il sito *Bgl*II mappa nel gene dello snRNA U1, in posizione -6 rispetto al sito di inizio della trascrizione, mentre il sito *Nhe*I è nel vettore, 300 nucleotidi a monte del promotore SP6. Il linker è stato ottenuto per ibridazione con i due oligonucleotidi:

linkup: 5'-GATCTGGTACCCTCGAGGCTAGCGGATCCG-3'

linkdn: 5'-CTAGCGGATCCGCTAGCCTCGAGGGTACCA-3'.

Costruzione di derivati di psiU che esprimono siRNAs per la proteina lamina A/C.

La sequenza bersaglio selezionata sulla lamina A/C è stata derivata da Sui *et al.* (2002) e copre i nucleotidi 1602-1622 di X03444 del database NCBI. I seguenti oligo:

a-lamUP 5' GATCTCATACAGGGCAATTGGCAGATCAAGCGTTGTGAAGCCAC
AGATGAACGCTTGATCTGCCAATTGCCCTTTATCCCCTGACTTTCTGGAGTTTCA
AAAGTAGAC 3'

e *a-lamDN* 5' TCGAGTCTACTTTTGAAACTCCAGAAAGTCAGGGGATAAAGG
GCAATTGGCAGATCAAGCGTTCATCTGTGGCTTCACAACGCTTGATCTGCCAATT
GCCCTGTATGA 3'

sono stati ibridati e inseriti nei siti *Bgl*II e *Xho*I di psiUx, formando il plasmide psiUa-lam. I plasmidi psiUb-lam e psiUc-lam sono stati ottenuti per clonazione nei siti *Bgl*II e *Xho*I di psiUx dei seguenti oligo:
psiUb-lam :



b-lamUP 5'GATCTCATACAGGGCAATTGGCAGATCAAGCGTTTGTGTAGCGCT
TGATCTGCCAATTGCCCTTTATCCCCTGACTTTCTGGAGTTTCAAAAGTAGAC3'

e *b-lamDN*

5'TCGAGTCTACTTTTGAAACTCCAGAAAGTCAGGGGATAAAGGGCAATTGGCAG
ATCAAGCGCTACACAAACGCTTGATCTGCCAATTGCCCTGTATGA3'

psiUc-lam:

c-lamUP 5'GATCTCGGGCAATTGGCAGATCAAGCGTTTGTGTAGCGCTT
GATCTGCCAATTGCCCTTACTTTCTGGAGTTTCAAAAGTAGAC3'

e *c-lamDN*

5'CTGAGTCTACTTTTGAAACTCCAGAAAGTAAGGGCAATTGGCAGATCAAGCGCT
ACACAAACGCTTGATCTGCCAATTGCCCCGA3'

psiUd-lam:

d-lamUP 'GATCTCGGGCAATTGGCAGATCAAGCGTTTGACTTCGCATGAATGAG
TTCATTCATGAAGCGAAACGCTTGATCTGCCAATTGCCCTTACTTTCTGGAGTTTC
AAAAGTAGAG3'

e *d-lamDN* 5'CTAGCTCTACTTTTGAAACTCCAGAAAGTAAGGGCAATTGGC
AGATCAAGCGTTTCGCTTCATGAATGAACTCATTTCATGCGAAGTCAAACGCTTGA
TCTGCCAATTGCCCCGA3'.

Il plasmide psiUc_{mut}-lam è stato ottenuto per clonazione degli oligo:

cmut-lamUP 5'GATCTCGGGCAATTG_{cg}AGATCAAGCGTTTGTGTAGCGCTT
GATCT_{cg}CAATTGCCCTTACTTTCTGGAGTTTCAAAAGTAGAC3'

e *cmut-lamDN* 5'CTGAGTCTACTTTTGAAACTCCAGAAAGTAAGGGCAAT
TG_{cg}AGATCAAGCGCTACACAAACGCTTGATCT_{cg}CAATTGCCCCGA3'

(le lettere in minuscolo indicano i nucleotidi mutati rispetto alla
sequenza della lamina).

Culture cellulari e trasfezione. Cellule HeLa subconfluenti sono state trasfettate in piastre da 60 mm usando Lipofectamina 2000 (Life Technologies, Gibco BRL) secondo le istruzioni della casa. 6µg di derivati del plasmide psiUx sono stati trasfettati con 2 µg del plasmide U7-3' (De Angelis *et al.*, 2002) come controllo interno della trasfezione.

Microiniezione in oociti di *Xenopus laevis*. 9.2 nl di DNA plasmidico (300 ng/µl) sono stati iniettati nel nucleo di oociti di *Xenopus laevis* allo stadio IV secondo Caffarelli *et al.* (1987). Dopo 12 ore di incubazione a 19°C, i nuclei e citoplasmi sono stati dissezionati manualmente e l'RNA estratto come descritto (Caffarelli *et al.*, 1987).

Northern blotting. L'isolamento di RNA totale da cellule HeLa trasfettate in maniera transiente è stato effettuato con il sistema Ultraspec RNA (Biotech Laboratories, Houston) secondo le istruzioni della casa. Per rivelare gli siRNA, 15 ug di RNA totale sono stati sottoposti ad elettroforesi in un gel 10% poliacrilammide-8 M urea e trasferiti per elettroblotting su membrana Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia Biotech.). L'ibridazione è stata effettuata a 37°C in 5X SSPE, 5X soluzione di Denhardt, 0,5% SDS, 25 µg/ml DNA di sperma di salmone (Invitrogen). I lavaggi sono stati effettuati a 37°C in 6X, 2X e 0.2X SSPE. Le sonde usate, marcate terminalmente con ³²P, sono: sonda a: 5'-GGCAATTGGCAGATCAAGCG-3'; sonda a-mut: 5'-GGCAATTGcgAGATCAAGCG-3'; sonda α: 5'-CGCTTGATCTGCCAATTGCC-3'. Il trascritto U7-3' è stato rivelato con la sonda U7a (De Angelis *et al.*, 2002).

Immunoblotting. Gli estratti proteici (20µg) sono stati separati su gel 10% poliacrilammide-SDS e trasferiti su nitrocellulosa (ProTran, Schleicher and Schuell). Le membrane sono state bloccate con 3% latte magro in TBS. Un anticorpo monoclonale di topo anti-lamina A/C (sc-7292, Santa Cruz Biotechnology) diluiti 1:200 in TBS/3% latte è stato usato come anticorpo primario. L'immunocolorazione è stata effettuata usando il sistema di rivelazione ECL Western blotting (Amersham UK).

Risultati

Il sistema messo a punto sfrutta le proprietà del gene snRNA U1 umano e delle sue regioni promotore e terminatore (Hernandez, 1985, Hernandez and Weiner, 1986). Il promotore di U1 è regolato dalla RNA polimerasi II, è attivo in maniera ubiquitaria e garantisce alti livelli di espressione. Il trascritto primario ha un cap monometilato e l'RNA è efficientemente esportato nel citoplasma. Questo è estremamente importante per l'efficace processamento del pre-siRNA in quanto è stato dimostrato che l'enzima Dicer è localizzato nel citoplasma (Billy *et al.*, 2001). Inoltre, la formazione corretta del 3' dello snRNA U1 è diretta da una sequenza (GTTTCAAAAGTAGAC- 3' box) localizzata 10 nucleotidi a valle dalla regione codificante dello snRNA U1, che funziona solo in associazione con la sequenza specifica del promotore U1 (Hernandez and Weiner 1986; de Vegvar *et al.*, 1986). Una sequenza simile è stata trovata anche per la formazione del 3' dello snRNA U2 (Hernandez, 1985). A riguardo è stato suggerito che questi snRNAs devono essere trascritti da un insieme di attività specializzate

per la trascrizione che differisce da quello che sintetizza gli mRNA. Medlin *et al.* (2003) hanno mostrato che la terminazione non avviene in maniera corretta se la CTD di pol II è deleta, indicando che i fattori richiesti per la formazione del 3' sono richiesti ai primi stadi della trascrizione.

La regione contenente il promotore per il gene dello snRNA U1 dal sito BamHI, in posizione - 400, al sito BglII, in posizione - 6 rispetto al sito di inizio, è stato clonata nei siti BamHI/NheI del plasmide pSP65 a mezzo di polilinker sintetici (figura 1A). Il costrutto risultante (psiUx) ha un promotore molto forte ma manca sia del sito d'inizio della trascrizione che del terminatore. Secondo l'attuale disegno, questi elementi devono essere forniti, insieme alle sequenze target dello siRNA, dalla sequenza da clonare. La sequenza di inizio è 5'-GATCTC'A-3', in cui l'ultimo residuo corrisponde al nucleotide +1 dello snRNA U1 (una G è anche accettata in questa posizione). L'elemento terminatore è 5'-**CCCCTG'ACTTTCTGGAGTTTCAAAAGTAGAC**-3', in cui la sequenza sottolineata è la "3' box", localizzata 10 nucleotidi a valle del 3' del trascritto. La sequenza CCCCTG corrisponde agli ultimi 6 nucleotidi dello snRNA U1 che contribuisce ad un'efficace e sito-specifica formazione del 3' (Hernandez, 1985). Il clonaggio della sequenza del precursore dello siRNA in psiUx può essere effettuata molto facilmente inserendo un frammento amplificato o oligo sintetici ibridati con terminali compatibili con i siti selezionati del plasmide. Mentre un terminale 5' con il sito BglII è indispensabile per ricostruire il sito di

inizio, qualunque degli altri siti contenuti nel polilinker (KpnI, XhoI, NheI and BamHI) possono essere utilizzati al 3' (Fig.1).

Come sequenza bersaglio per saggiare l'efficacia del vettore è stato selezionato un sito nell' mRNA della lamina A/C, sensibile agli siRNA (Sui *et al.*, 2002). Un "hairpin" di 21 nucleotidi di sequenze senso e antisense, derivate dall' mRNA della lamina A/C è stato clonato in diversi contesti per identificare quello più appropriato per una espressione efficace dello siRNA (costrutti psiU-lam). I costrutti risultanti differiscono non solo per il tipo di sequenza "loop" inserita, ma anche per i terminali 5' e 3' della regione trascritta. La sequenza dei diversi frammenti inseriti è indicata in fig.2A e la struttura dei trascritti primari è rappresentata schematicamente nel pannello B. I "loop" utilizzati in psiUa-lam, psiUb-lam e psiUc-lam sono dedotti dai micro pre-mRNAs (Zeng *et al.*, 2002 and Castanotto *et al.*, 2002), mentre quello presente in psiUd-lam è dedotto dal substrato canonico della endonucleasi di lievito Rnt1p, un enzima RNaseIII-simile (Chanfreau *et al.*, 1998). Inoltre, i costrutti psiUa-lam e psiUb-lam hanno una regione terminale comprendente uno stem di 3 nucleotidi che corrisponde alle sequenze conservate alle estremità 5' e 3' del trascritto U1. Al fine di prevenire taglio da parte di Dicer in questa regione sono state inserite due basi tra loro non appaiate. Queste estensioni sono assenti in psiUc-lam e psiUd-lam: in questi due casi, per ottimizzare l'appaiamento con la sequenza bersaglio della lamina, il terminale 5' del trascritto include una G e la regione al 3' è stata convertita da CCCCTG a CCCTT.



E' stato anche prodotto un costrutto di controllo, derivato da psiUc-lam (psiUc_{mut}-lam), che presenta una sequenza modificata di due nucleotidi nella parte centrale della regione di appaiamento con l'mRNA della lamina. Gli siRNA prodotti da questo costrutto dovrebbero essere incapaci di mediare una risposta di interferenza da

Per paragonare l'attività di questi vettori con altri già utilizzati, è stata clonata una sequenza "hairpin" antilamina A/C nel vettore U6 (plasmide U6-lam) come descritto da Sui *et al.* (2002).

Tutti i diversi costrutti sono stati saggiati per espressione e attività di interferenza per trasfezione in cellule HeLa. Un gene codificante per lo snRNA U7 modificato (DeAngelis *et al.*, 2002) è stato co-trasfettato come controllo interno. A 48 ore, l'RNA era estratto e analizzato per Northern blot.

I pannelli A e A' della Figura 3 mostrano ibridazioni con sonde senso (probe a): tutti i costrutti derivati da U1 producono l'accumulo delle eliche antisenso (l'elica inferiore secondo lo schema di fig. 2B) con una dimensione tra 21 e 23 nucleotidi. Poiché questi RNA si accumulano in vivo dopo tempi prolungati, si deve dedurre che sono presenti in forma di complessi stabili. Risultati simili sono stati ritenuti indicativi di associazione con complessi competenti per l'interferenza. Lo stesso tipo di molecole, di 21-23 nucleotidi, si accumula nel caso di costrutti derivati da U6 (corsie U6). Il confronto tra i livelli degli siRNA prodotti dai promotori U6 e U1, dopo normalizzazione con il segnale di ibridazione dello snRNA U7 co-trasfettato (pannello A''), indica che i livelli trascrizionali dei costrutti psiU-lam sono leggermente più bassi di

quelli di U6-lam. Gli siRNA prodotti dai derivati di psiUc_{mut}-lam è solo visibile con la sonda *a_{mut}* che ha una complementarità perfetta con la mutazione (fig. 3A').

Le ibridazioni effettuate con la sonda antisenso (*probe α*, pannello B) rivela un'interessante peculiarità: i costrutti psiUa-lam e psiUb-lam non mostrano l'accumulo dell'elica senso (l'elica superiore secondo lo schema di fig. 2B) anche a esposizioni molto prolungate del gel. Al contrario, tutti gli altri costrutti mostrano la produzione dell'elica senso anche se a livelli più bassi rispetto all'elica antisenso (si vedano i segnali di ibridazione dei precursori rispetto alle specie mature nei pannelli A e B). Questi risultati indicano che la regione terminale dei costrutti psiUa-lam e psiUb-lam (si veda fig. 2B), e non il "loop" interno, è l'elemento che conferisce la selezione asimmetrica dell'elica inclusa nel complesso di interferenza.

L'analisi dell'espressione dei diversi plasmidi psiU (Fig. 3A), e di altri costrutti prodotti indipendentemente, ha indicato inoltre che è possibile eliminare la maggior parte dei nucleotidi conservati al 3' dello snoRNA U1 e ancora ottenere un processamento e una terminazione corretti. Pertanto, le restrizioni di sequenza per il clonaggio nel vettore psiU e per l'ottenimento di siRNA correttamente processati è solo la presenza di una A o di una G in posizione +1.

Una differenza interessante tra i vettori per siRNA pol III e pol II è che, nel caso dei vettori basati sul promotore U1, sono evidenziabili solo piccole quantità di precursore non tagliato (indicato come pre-siRNA);

al contrario, questa specie è molto più abbondante nel caso del vettore U6 (Fig. 3A).

Una possibile spiegazione per questa differenza è che i trascritti ottenuti dal promotore di U6 non vengono efficientemente esportati nel citoplasma. Per verificare questa ipotesi, U6-lam, e i plasmidi psiUa-lam e psiUb-lam sono stati microiniettati nel nucleo di oociti di *X.laevis* e, dopo 12 ore di incubazione, l'RNA è stato estratto dai compartimenti nucleare e citoplasmatico. La Fig. 4 indica che una grande proporzione dei trascritti U6-lam sono ritenuti nel nucleo, mentre nessuna traccia dei trascritti prodotti dal promotore U1 viene ivi ritrovata. In entrambi i casi, sono presenti solo gli RNA di dimensione attesa per una molecola precursore (pre-siRNA) con specie di RNA più piccole originate da tagli endonucleolitici all'interno del "loop". Nel sistema *Xenopus*, solo minime quantità di oligo di 21-23 nt. sono visualizzate dopo lunghe sovraesposizioni, indicando che un'attività Dicer-simile, se presente, è in quantità molto piccole. Questi dati indicano che i pre-siRNA prodotti con il promotore U1 sono esportati in maniera efficiente nel citoplasma. Le stesse cellule analizzate per la produzione degli siRNA sono state anche saggate per l'attività di RNA interference. 20 µg di estratti proteici totali da cellule trasfettate in maniera transiente con i costrutti derivati da U1 e U6 sono stati analizzati per Western con anticorpi anti-lamina A/C. Come mostrato in fig. 3B, tutti i costrutti producono buoni livelli di interferenza, se si considera che l'efficienza di trasfezione in questo tipo di esperimenti è dell'ordine di 80-85%. Il livello di di

diminuzione della lamina è simile tra tutti i costrutti U1 e quelli derivati da U6.

La specificità della risposta all'interferenza è stata saggiata in cellule HeLa con un costrutto contenente due "mismatches" nella parte centrale della regione di appaiamento di 21 nucleotidi (psiUc_{mut}-lam). Mentre i livelli di accumulo degli siRNAs da questo costrutto sono simili a quelli ottenuti con il costrutto parentale (fig. 3A'), essi non mediano l'interferenza come indicato dai livelli di accumulo di lamina (fig. 3B, corsia mut) che sono simili al controllo (corsia NT).

I dati indicano che i vettori derivati da U1 hanno caratteristiche e vantaggi rispetto ad altri vettori per siRNA: i) hanno una richiesta di sequenze minime al 5' e 3' dei trascritti; ii) accettano sequenze di U nella regione trascritta, a differenza di quanto occorre per i vettori con promotori dipendenti da polIII; iii) il clonaggio è molto facile e permette la selezione tra diversi siti; iv) i trascritti primari sono esportati velocemente al citoplasma dove sono convertiti efficientemente nella forma matura. Inoltre, sequenze specifiche possono essere inserite ai terminali 5' e 3' permettendo la selezione della singola elica del siRNA che deve essere incorporata nel complesso di interferenza. Questa è una caratteristica assai importante per un vettore per siRNA in quanto si elimina l'accumulo dell'elica senso che potrebbe mediare un targeting indesiderato.

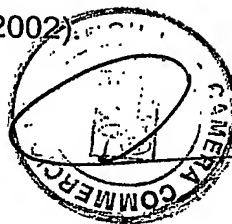
Bibliografia

Billy, E., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25,14428-33 (2001).



- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. *Science* **296**, 550-553 (2002).
- Caffarelli, E., et al. *EMBO J.* **6**, 3493-8 (1987).
- Castanotto, D., Li, H. & Rossi, J.J. *RNA*. **8**,1454-1460 (2002).
- Chanfreau, G., Legrain, P. & Jacquier, A. *J. Mol. Biol.* **284**, 975-988 (1998).
- De Angelis, F.G., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 9456-9461 (2002).
- de Vegvar, H.E., Lund, E. & Dahlberg, J.E. *Cell* **47**,259-266 (1986).
- Elbashir, S.M., et al. *Nature* **411**, 494-498 (2001).
- Fire, A., et al. *Nature* **391**,806-811 (1998).
- Hernandez, N. *EMBO J.* **7**,1827-1837 (1985).
- Hernandez, N. & Weiner, A.M. *Cell* **47**,249-258 (1986).
- Kawasaki, H. & Taira, K. *Nucleic Acids Res.* **31**, 700-707 (2003).
- Lee, N.S., et al. *Nat. Biotechnol.* **20**,500-505 (2002).
- McManus, M.T. & Sharp, P.A. *Nat Rev Genet.* **10**,737-747 (2002).
- Medlin, J.E., et al. *EMBO J.* **22**,925-934 (2003).
- Paul, C.P., et al. *Nat. Biotechnol.* **20**, 505-508 (2002).
- Sui, G. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5515-5520 (2002).
- Zeng, Y., Wagner, E.J. & Cullen, B.R. *Mol Cell.* **9**, 1327-1333 (2002).

dga capasso



RM 2003 A 000335

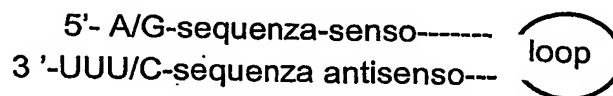
RIVENDICAZIONI

1. Vettore ricombinante per la corretta, stabile ed efficace espressione in cellule di mammifero di un siRNA da utilizzare per il silenziamento di un gene, comprendente dal 5' al 3':

a) una sequenza promotore dipendente dalla RNA polimerasi II derivata dal gene per lo snRNA U1;

b) opportuni siti di restrizione per la clonazione della sequenza trascrivente un pre-siRNA;

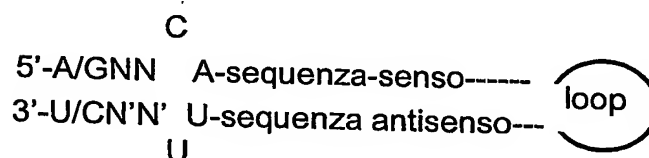
c) una sequenza trascrivente il pre-siRNA comprendente in posizione +1 un residuo A o G; una sequenza da 21 a 23 nucleotidi corrispondente a una regione senso del mRNA trascritto dal gene da silenziare che costituisce il primo segmento dello "stem" del pre-siRNA; una sequenza selezionata dal gruppo di sequenze dei pre-miRNA che costituisce la regione "loop" del pre-siRNA; una sequenza da 21 a 23 nucleotidi corrispondente alla regione antisenso del mRNA trascritto dal gene da silenziare che costituisce il secondo segmento dello "stem" del pre-siRNA; due residui finali UU protrudenti in maniera da ottenere la seguente struttura:



d) sequenze terminatrici derivanti da sequenze al 3' del gene per lo snRNA U1 necessarie e sufficienti per una corretta formazione del 3' del pre-siRNA.

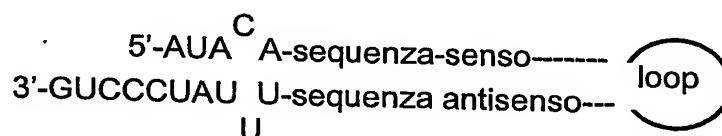
2. Vettore secondo la rivendicazione 1 in cui il sito di clonaggio per il 5' della sequenza trascrivente il pre-siRNA è Bgl II.

3. Vettore secondo la rivendicazione 1 in cui la sequenza trascrivente il pre-siRNA comprende ulteriormente ai terminali 5' e 3' sequenze tali che il pre-siRNA trascritto abbia la seguente struttura:



in cui N è A, U, G o C e N' è il suo complementare.

4. Vettore secondo la rivendicazione 3 in cui la sequenza trascrivente il pre-siRNA comprende ulteriormente ai terminali 5' e 3' sequenze tali che il pre-siRNA trascritto abbia la seguente struttura:



Roma,

p.p. Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

de Simone & Partners SpA

de Simone

OC

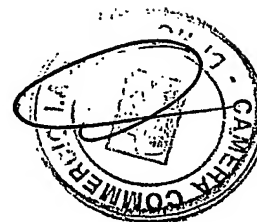
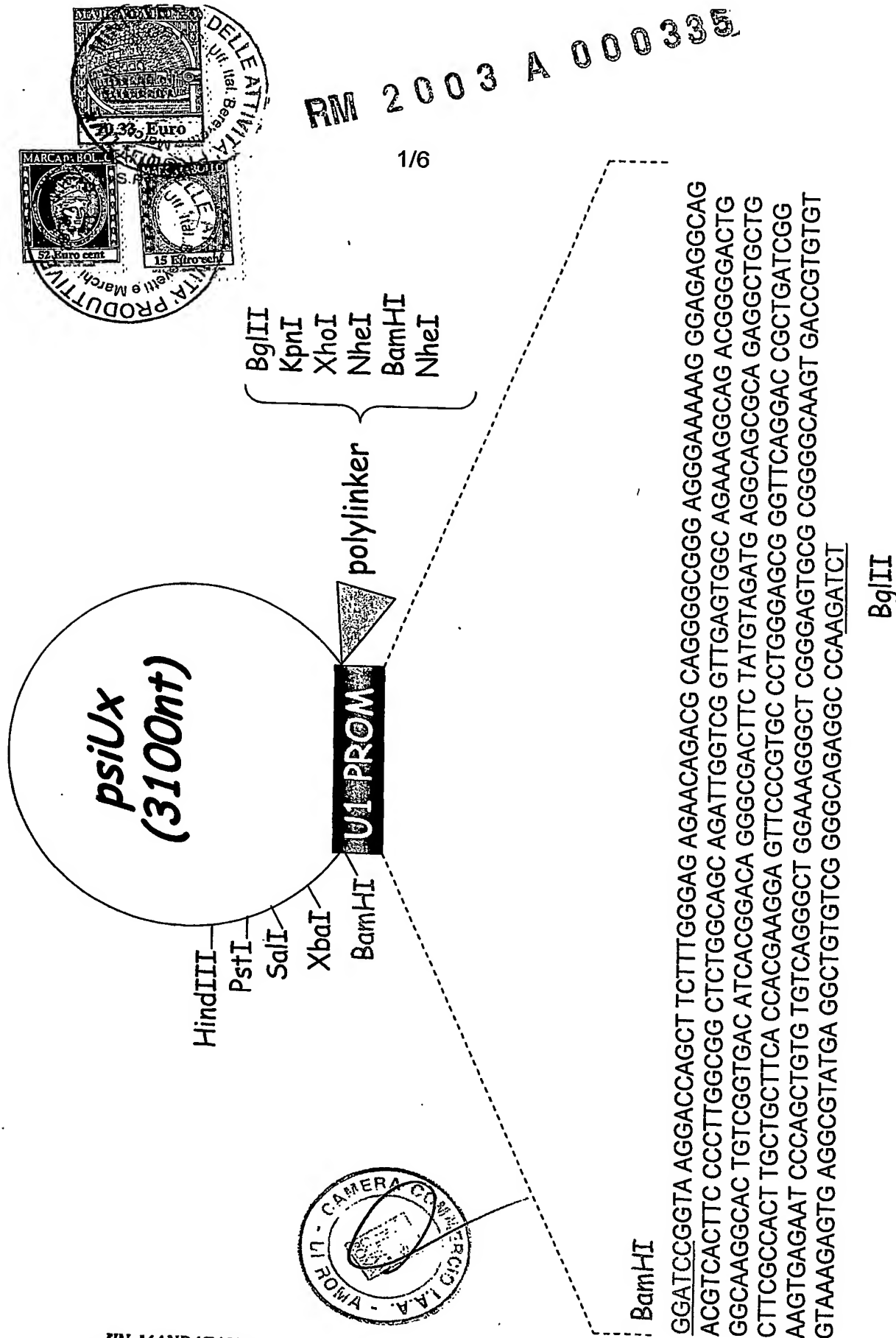


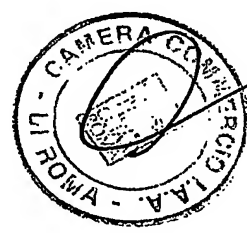
Fig. 1



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)
Olga Capasso

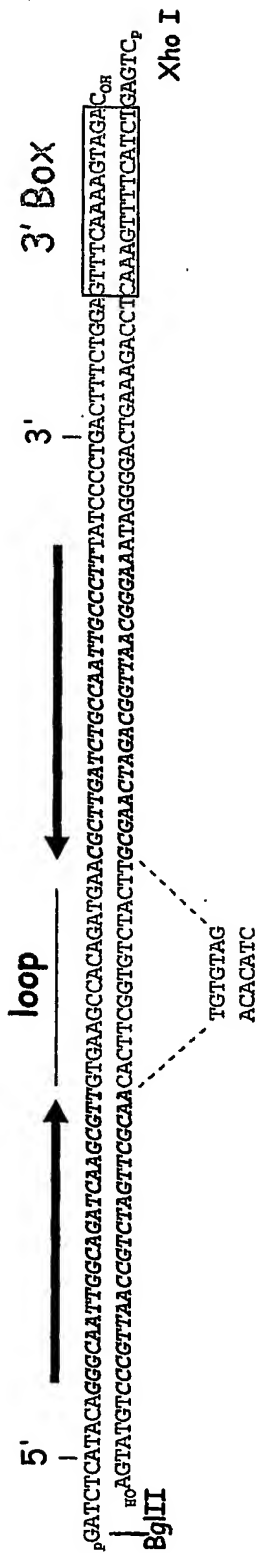
RM 2003 A 000333

1/6

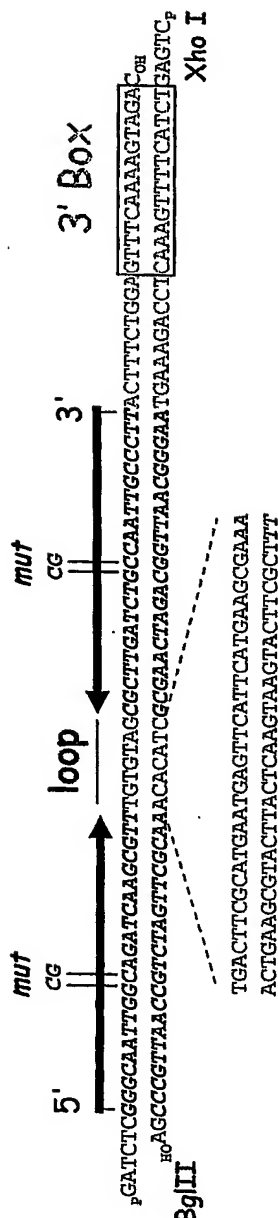


A)

psiUa-lam / psiUb-lam



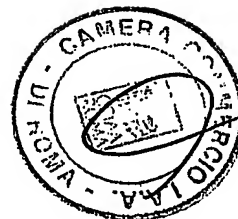
psiUc-lam / psiUd-lam / psiUc_{mut}-lam



2/6

RM 2003 A 000335

Fig. 2



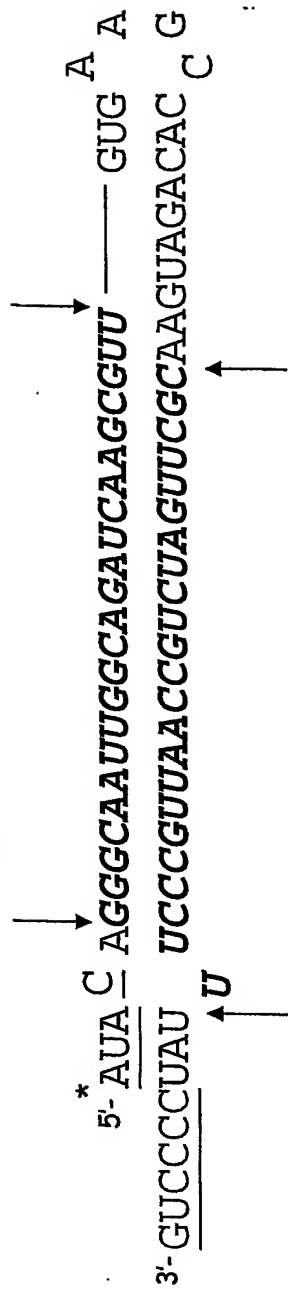
UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)

Olga Capasso

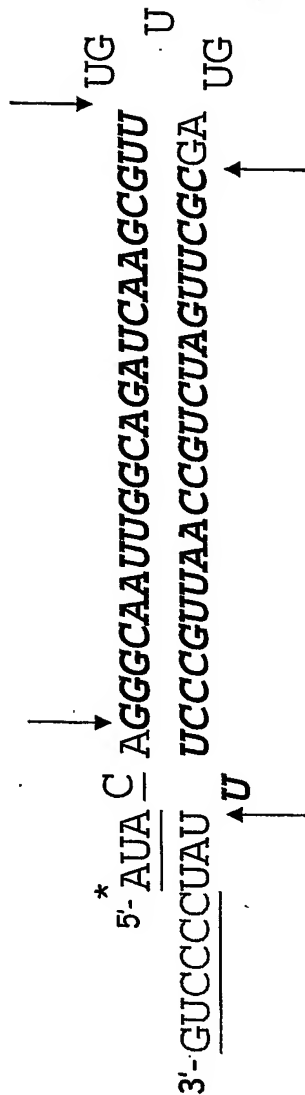
B)

Fig. 2

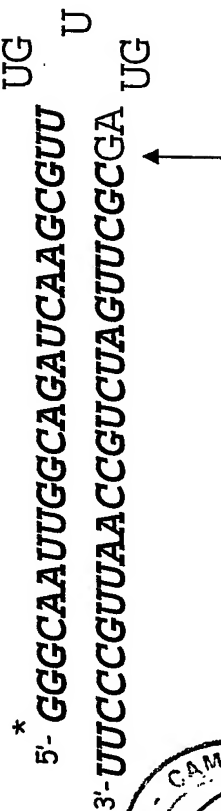
psiUa-lam



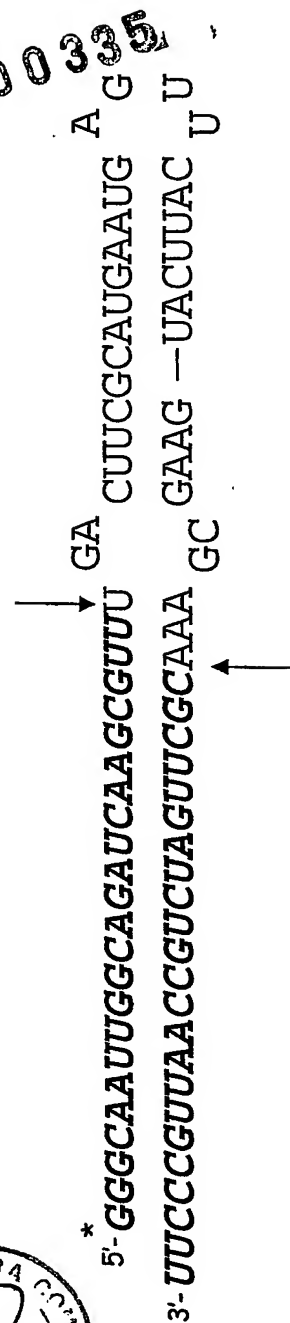
psiUb-lam



psiUc-lam

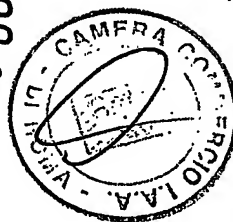


psiUd-lam



3/6

RM 2003 A 000335



UN MANDATARIO
 per se e per gli altri
 Olga Capasso
 (N° d'Iscri. 820 B)

PM 2003 A 000335

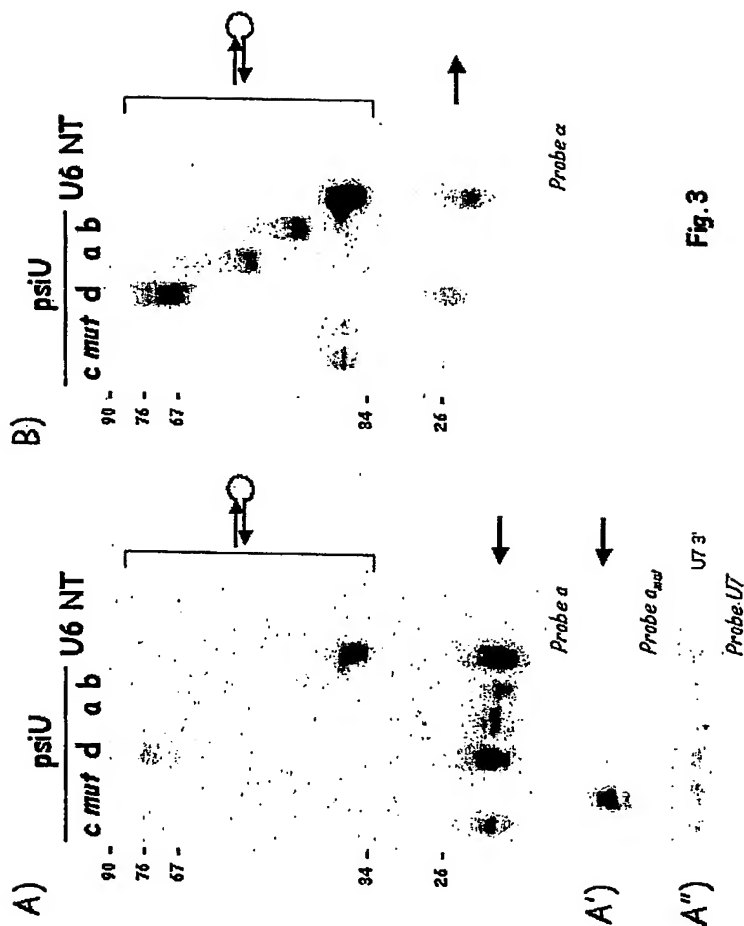
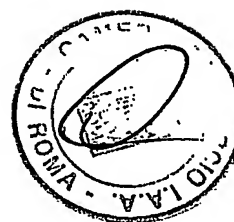


Fig. 3

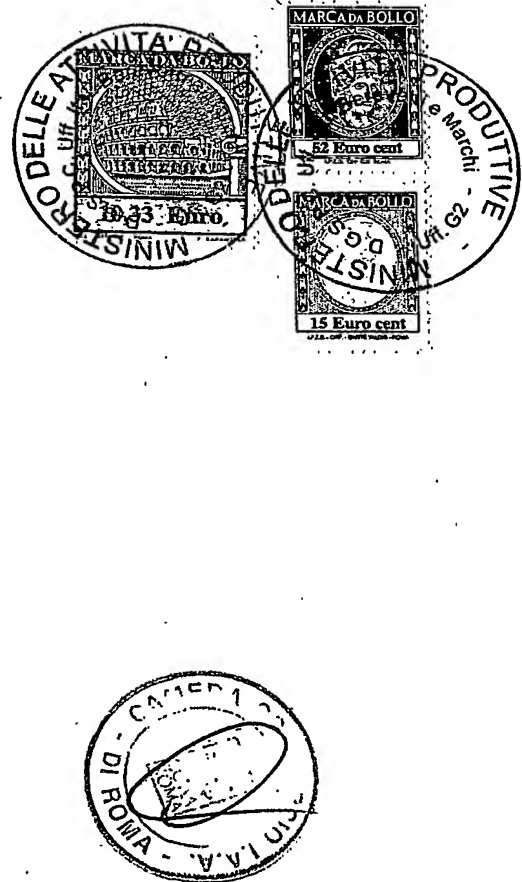
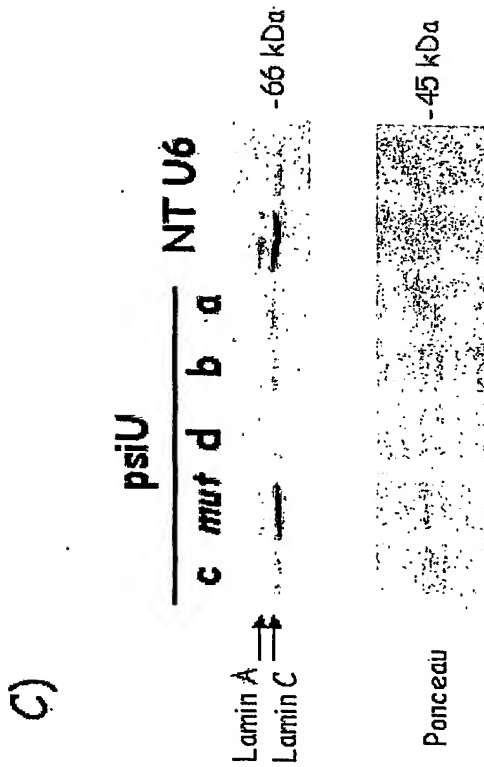


UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'iscri. 820 B)

Olga Capasso

2003 A 000335

Fig. 3



UN MANDATARIO
per se e per gli altri.
Olga Capasso
(N° d'iscr. 820 B)

olga capasso

3M 2003 A 000335

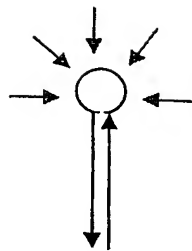
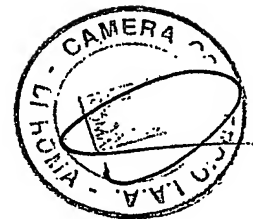
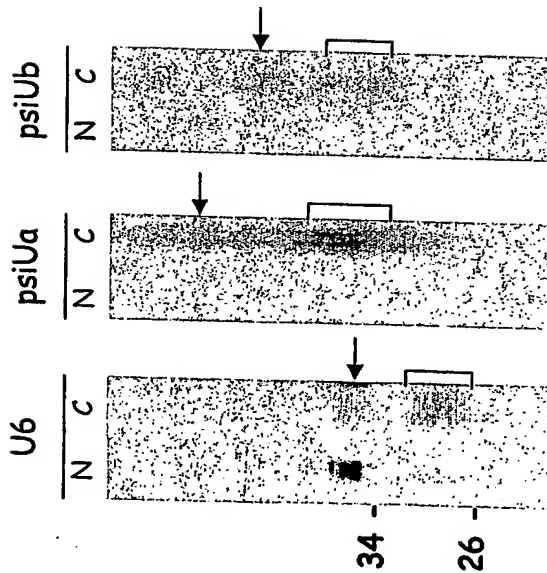


Fig. 4



UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Olga Capasso
(N° d'isr. 820 B)

d'Agostino

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.